

陕西省小麦白粉菌群体毒性结构及遗传多样性

李 强¹ 申雪雪¹ 杨金叶¹ 吴 蕾¹ 邵育娟² 王保通^{1*}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2. 咸阳市植物检疫站, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 为明确近年来陕西省小麦白粉菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 群体毒性及遗传变异情况, 利用 32 份已知抗白粉病基因小麦品种(系)对 2013 年和 2014 年陕西省小麦白粉菌群体毒性结构进行测定, 并应用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记对 2014 年陕西省西安市、咸阳市、渭南市、宝鸡市及陕西省毗邻的甘肃省天水市 5 个小麦白粉菌地理群体共 118 株白粉菌菌株进行遗传多样性分析。毒性监测结果显示, 供试小麦白粉菌群体对 *Pm1c*、*Pm2*、*Pm3d*、*Pm4a*、*Pm4b*、*Pm5b*、*Pm13*、*Pm21*、*Pm24*、*Pm30*、*Pm2+6*、*Pm2+Mld*、*Pm2+6+?*、*Pm4b+5b*、*Pm4+?*、*Pm5+6* 的平均毒性频率在 0~17.23% 之间, 表明这些基因抗性保持较好; 对 *Pm1a*、*Pm3b*、*Pm3c*、*Pm3e*、*Pm3f*、*Pm7*、*Pm8*、*Pm19*、*Pm1+2+9* 的平均毒性频率介于 69.17%~99.60% 之间, 表明这些基因抗性已丧失。用筛选出的 6 对 AFLP 标记共扩增出 831 个多态性位点, 多态性位点百分比为 94.86%; 小麦白粉菌群体遗传多样性指数和香农信息指数分别为 0.1151 和 0.2036, 遗传变异主要来源于群体内变异。群体间基因流为 4.7939, 表明 5 个小麦白粉菌群体间基因交流广泛。群体间遗传距离和地理距离两者显著正相关。

关键词: 小麦; 白粉菌; 毒性结构; 遗传多样性; 扩增片段长度多态性

Virulence and genetic diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* collected from Shaanxi Province

Li Qiang¹ Shen Xuexue¹ Yang Jinye¹ Wu Lei¹ Shao Yujuan² Wang Baotong^{1*}

(1. State Key Laboratory for Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Xianyang Station of Plant Quarantine, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China)

Abstract: To characterize the virulence and genetic diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) population in Shaanxi Province, a total of 238 isolates collected from the province were tested against 32 wheat cultivars (lines) with known powdery mildew resistance genes in 2013 and 2014; the genetic diversity of 118 isolates from five geographical populations in Xi'an City, Xianyang City, Weinan City and Baoji City of Shaanxi Province and Tianshui City of Gansu Province was analyzed in 2014 with amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. The mean virulence frequencies of the resistance genes *Pm1c*, *Pm2*, *Pm3d*, *Pm4a*, *Pm4b*, *Pm5b*, *Pm13*, *Pm21*, *Pm24*, *Pm30*, *Pm2+6*, *Pm2+Mld*, *Pm2+6+?*, *Pm4b+5b*, *Pm4+?* and *Pm5+6* were 0–17.23%, indicating that these genes were still effectively resistant to *Bgt*, whereas those of *Pm1a*, *Pm3b*, *Pm3c*, *Pm3e*, *Pm3f*, *Pm7*, *Pm8*, *Pm19* and *Pm1+2+9* were 69.17%–99.60%, suggesting that these genes had lost their resistance in Shaanxi Province. A total of 831 polymorphic bands were identified by six AFLP markers, with a diversity frequency of

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0300705), 国家公益性行业(农业)科研专项(201303016)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wangbt@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2017-10-19

94.86%。The Nei's gene diversity and Shannon's information index of *Bgt* populations were 0.1151 and 0.2036, respectively. The genetic variation of *Bgt* isolates mainly occurred within the population. The gene flow values of the five geographical populations were 4.7939, which indicated that the sufficient exchange of genes happened among these populations. Moreover, there was a significant positive correlation between their geographic distances and genetic diversity.

Key words: wheat; *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; virulence structure; genetic diversity; amplified fragment length polymorphism (AFLP)

小麦白粉病是由专性寄生菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 引起的气传真菌性病害(何家泌等, 1998)。从20世纪70年代末以来,随着小麦矮秆品种的推广和水肥条件的改善,特别是黑麦血缘1B/1R含 *Pm8* 基因品种的大面积推广,我国小麦白粉病发病面积和危害程度一直维持在一个较高的水平。种植抗病品种是防治该病最经济、有效和安全的措施。由于小麦白粉菌传播范围广、繁殖变异速度快、毒性强等特点,抗病品种大面积推广种植3~5年便丧失抗病性,因此,明确小麦白粉菌的毒性结构对小麦抗病育种及品种合理利用有重要意义。同时小麦白粉病为典型的气传病害,存在远距离传播,因此研究白粉菌群体的遗传多样性,明确其地区间病菌的亚群体交流,对进一步了解白粉病的流行规律和制定病害防治策略具有重要指导意义。

目前国内外普遍采用一套已知抗性基因品种(系)进行小麦白粉菌群体毒性结构监测。Parks et al.(2008)和EI-Shamy et al.(2016)分别应用16个和21个已知抗白粉病基因材料监测了2003—2005年美国东南部和2013—2014年埃及小麦白粉菌的群体毒性结构。国内近年来对河南(李亚红等,2012)、四川(雷雨等,2015)、甘肃(黄瑾等,2015)、黑龙江(李易初等,2015)、山东(郭霞等,2016)和新疆(王振花等,2017)等小麦主要产区小麦白粉菌的毒性结构也开展了大量研究,基本明确了各地小麦白粉菌的毒性基因频率和有效抗病基因。

随着DNA分子标记技术的快速发展,随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)、简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphisms, SRAPs)和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)等标记技术已经被广泛用于小麦白粉菌遗传多样性的研究(Brown & Simpson 1994; Wy-

and & Brown 2003; 贾少锋等,2007)。应用以上分子标记技术,肖仲久等(2009)、Xu et al.(2014)和Liu et al.(2015)分别对贵州、青海和四川省的小麦白粉菌群体遗传多样性进行了报道;霍云凤等(2010)、赵紫慧等(2013)和朱桂清等(2015)分别对河南、山东和河北及东北地区的小麦白粉菌群体遗传多样性进行了研究。此外,霍云凤等(2010)比较了ISSR和AFLP两种标记对白粉菌群体遗传多样性检测的有效性及其灵敏度,表明2种标记都适用于遗传多样性分析,但AFLP比ISSR更灵敏。

陕西省小麦常年种植面积约108万 hm^2 ,近年来小麦白粉病危害面积和程度呈增加趋势,据2015—2018年陕西省植物保护总站统计,该病年均发生面积约46万 hm^2 ,占小麦种植面积的1/2左右,尤其是秦岭北麓沿线地区,发生和危害程度较严重。史亚千等(2009)对2008年陕西省小麦白粉菌群体毒性结构进行了监测,但对遗传多样性未进行研究。为明确近年来陕西省小麦白粉菌群体毒性结构和遗传变异情况,利用32个已知抗白粉病基因材料测定2013年和2014年该省小麦白粉菌的群体毒性结构,并应用AFLP标记对陕西省西安市、咸阳市、渭南市、宝鸡市和毗邻该省的甘肃省天水市5个小麦白粉菌群体进行遗传多样性分析,以期小麦抗病育种、品种合理布局以及病害防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和植物:2013年和2014年于小麦白粉病发病初期至盛期(4月初—5月中旬)分别从陕西省西安市户县、高陵县和周至县,咸阳市乾县、三原县、泾阳县、武功县、兴平市和杨陵区,渭南市合阳县、澄城县、富平县、蒲城县、大荔县、华县和华阴市,宝鸡市陈仓区、眉县、岐山县和扶风县等县(区)的不同乡镇大田成株期小麦上采集小麦白粉菌标样。小麦白粉菌的分离、纯化和扩繁所用小麦品种为白粉病感病品种辉县红,由西北农林科技大学植物保护

学院小麦病原真菌监测与抗病遗传实验室提供。用于毒性鉴定的32个已知抗白粉病基因的小麦品种(系)包括 Axminster/8Cc、MIN、Ulka/8Cc、Asosan/8Cc、Chul/8Cc、Sonora/8Cc、Kolibri、W150、Mich. Amber/8Cc、Khapli/8Cc、Armada、Aquila、Timgalen、Coker 747、CI14189、Kavkaz、R4A、Amigo、XX186、南农 9918、赤牙糙、5P27、CI12632、Maris Dove、Maris Huntsman、Kengua 1、Mission、白兔 3号、Coker 983、Normandie、Era、小白冬麦;2个感病小麦对照品种阿夫和 Chancellor。以上品种(系)以及用于外群分析的甘肃省天水市的19株小麦白粉菌菌株,均由中国农业科学院植物保护研究所小麦白粉病实验室提供。

0.45%水琼脂培养基:琼脂粉 0.9 g、去离子水 200 mL、0.012 g 苯并咪唑。

试剂及仪器: *Taq* 酶,加拿大 MBI Fermentas 公司; dNTP、PCR-Mix,生工生物工程(上海)股份有限公司; AFLP Digest-Ligation Buffer、AFLP Digest-Ligation Enzyme Mix 内切酶和 T4 连接酶,纽英伦生物技术(北京)有限公司;分子量内标 Liz-500,美国 ABI 公司;其它试剂均为国产分析纯。BioSpec-nano 微量分光光度计,日本岛津公司;Quantumst 4 凝胶成像系统,法国 Vilber 公司;JY-SPCT 水平电泳槽,北京君意东方电泳设备有限公司;3730XL 测序仪,美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 小麦白粉菌的分离、纯化和保存

参照霍云凤等(2010)方法对2013年和2014年所采集的小麦白粉菌标样进行分离纯化,分别得到125株和113株单孢子堆菌株。所得单孢子堆菌株保存在感病品种辉县红试管苗上,于4℃冰箱中保存,30~40 d 转接1次。毒性鉴定和遗传多样性分析之前,将所有单孢子堆菌株分别从试管苗上转接到辉县红的盆栽苗上进行扩繁,得到足够的分生孢子用于后续试验。

1.2.2 陕西省小麦白粉菌群体的毒性结构分析

分别对陕西省西安市、咸阳市、渭南市和宝鸡市2013年的125株小麦白粉菌菌株和2014年的113株小麦白粉菌菌株进行毒性结构分析。采用幼苗离体叶段接种方法测定小麦白粉菌的毒性频率(明章勇等,2012)。将已知抗白粉病基因的32个小麦品种(系)和2个感病小麦对照品种催芽后分别播种到直径为10 cm 的小花盆内,每盆播1个品种(系),约15~20粒种子。待幼苗第1片叶片完全展开后,在

超净工作台上剪取叶片中间部位叶段3 cm,依次摆放于8 cm×8 cm 方形培养皿的0.45%水琼脂培养基上(含60 mg/L 的苯丙咪唑),每个菌株3次重复。将方形培养皿置于接种塔底部,将收集的单孢子堆菌株的分生孢子分别接种到已知抗白粉病基因小麦品种(系)及感病对照品种上,接种后于17℃光照培养箱内培养,每日光照16 h、黑暗8 h。待感病对照小麦品种充分发病后,按照司权民等(1992)分级标准确定所有供试小麦品种(系)的反应型,其中,0、0;、1、2为抗病反应型,3、4为感病反应型。根据公式分别计算2013年和2014年小麦白粉菌的毒性频率,然后计算2年的平均值,毒性频率=毒力菌株/供试菌株×100%。

1.2.3 菌株DNA提取、AFLP扩增和PCR检测

小麦白粉菌菌株DNA的提取:从陕西省2014年分离纯化的113株菌株中随机选取99株,其中西安市20株、咸阳市32株、渭南市22株、宝鸡市25株,加上用于外群分析的甘肃省天水市的19株菌株,共5个地理群体118株菌株用于小麦白粉菌群体遗传多样性分析。将供试118株菌株在辉县红上扩繁收集分生孢子,利用CTAB法分别提取DNA(韩冰等,2006)。以1%琼脂糖凝胶电泳和BioSpec-nano 分别检测DNA的纯度和浓度。

AFLP检测的接头和引物: *EcoR* I 接头1和2(5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'), *Mse* I 接头1和2(5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/5'-TACTCAGGACTCAT-3'), E引物: E00(5'-GACTGCGTACCAATTC-3')、E42(5'-GACTGCGTACCAATTCAGT-3')、E45(5'-GACTGCGTACCAATTCATG-3')、E47(5'-GACTGCGTACCAATTCCTAA-3')、E78(5'-GACTGCGTACCAATTCGTT-3')及M引物: M00(5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3')、M47(5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3')、M49(5'-GATGAGTCCTGAGTAA-CAG-3')、M64(5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAC-3')、M65(5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAG-3')、M86(5'-GATGAGTCCTGAGTAATCT-3'),均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。AFLP 试验操作参考 Vos et al.(1995)方法。 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切:酶切反应与连接反应同步进行。20 μL 酶切与连接反应体系:10 μmol/L *EcoR* I 接头1 μL、10 μmol/L *Mse* I 接头1 μL、10×AFLP Digest-Ligation Buffer 2 μL、AFLP Digest-Ligation Enzyme Mix 1.8 μL、模板DNA 5 μL、ddH₂O 9.2 μL。酶切-连接反应条件

为25℃温育5 h, 1%琼脂糖电泳检测。

20 μL 预扩增反应体系: 20 μmol/L E00 1 μL、20 μmol/L M00 1 μL、2×PCR Mix 10 μL、酶切-连接模板 DNA 4 μL、ddH₂O 4 μL。PCR 扩增程序: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 50℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 30个循环。20 μL 选择性扩增体系: 20 μmol/L E引物 1 μL、20 μmol/L M引物 1 μL、2×PCR Mix 10 μL、模板 DNA 5 μL(预扩增产物稀释20倍)、ddH₂O 3 μL。PCR 扩增程序: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 35 s, 65℃复性 35 s(每循环降低0.7℃), 72℃延伸 1 min, 12个循环; 94℃变性 30 s, 56℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 23个循环。按100:1的体积比将甲酰胺与分子量内标 Liz-500 混匀, 然后取出 15 μL 加入上样板, 再加入 1 μL 稀释 10 倍的 PCR 产物, 最后用 3730XL 测序仪进行毛细管电泳。

1.2.4 陕西省小麦白粉菌群体遗传多样性分析

通过小样本的预试验, 筛选出 E42M65、E45M86、E47M47、E47M49、E78M64 和 E78M86 这 6 对多态性较好的引物组合, 利用这 6 对引物对供试 118 株菌株的基因组 DNA 进行荧光 AFLP 扩增。利用 GeneMarker 2.2 软件对 118 个样品 6 对引物组合扩增产物测序仪得到的原始数据进行分析, 将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置进行比较分析, 得到片段大小。再根据无带和有带情况转化为 0、1 二元数据矩阵。统计各引物组合扩增出的多态性条带数及多态性条带的大小, 根据公式计算多态性条带百分率, 多态性百分率=多态性条带数/总条带数×100%。

利用 POPGENE 32 软件计算小麦白粉菌 5 个地理群体的等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、基因多样性指数 H 、香农信息指数 I 等分子遗传多样性参数、Nei's 遗传距离和遗传一致度。根据 Nei's 遗传距离, 用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 对小麦白粉菌各地理群体进行聚类分析; 为明确地理距离对群体间分子遗传距离的影响, 运用 SPSS 软件进行各群体间的遗传距离和地理距离的相关性分析。

采用 Arlequin 3.1 软件计算遗传分化系数 G_{st} , $G_{st}=D_{st}/H_t$, $D_{st}=H_t-H_s$, 式中 D_{st} 为群体间遗传多样性, H_t 为总遗传多样性, H_s 为群体内遗传多样性。依据 Wright(1951)对遗传分化系数和基因流的界定, 当 $0 < G_{st} \leq 0.05$, 表示群体间分化较弱, $0.05 < G_{st} \leq 0.15$, 表示中等分化; $0.15 < G_{st} \leq 0.25$, 表示高度分化; $G_{st} > 0.25$, 表示重度分化。基因流 N_m 是用来估量种群间基因

交流的程度 (Nei, 1975; Slatkin, 1987), 根据公式估算基因流 N_m , $N_m=0.5 \times (1-G_{st})/G_{st}$ 。若 $N_m < 1$, 表明基因流不足以抵制遗传漂变引起的遗传分化, 群体蕴藏着遗传分化的潜能; 若 $N_m \geq 1$, 表明群体间基因流的水平较高, 群体间遗传分化较小; 当 $N_m > 4$, 表明种群间的基因交流就更为充分, 遗传分化更小 (Whitlock & McCauley, 1999)。

2 结果与分析

2.1 陕西省小麦白粉菌群体毒性结构

2013 年和 2014 年陕西省西安市、咸阳市、渭南市和宝鸡市 125 株和 113 株小麦白粉菌对 *Pm1a*、*Pm3b*、*Pm3c*、*Pm3e*、*Pm3f*、*Pm7*、*Pm8*、*Pm19*、*Pm1+2+9* 抗性基因的平均毒性频率介于 69.17%~99.60% 之间, 表明这些抗性基因已没有利用价值; 对 *Pm3a*、*Pm6*、*Pm17*、*Pm4+8*、*Pm“Era”*、*Pm“XBD”* 抗性基因的平均毒性频率介于 20.17%~44.40% 之间, 表明这些抗性基因仍有一定的利用价值, 但不建议单独使用, 应与其它抗性基因结合应用; 对 *Pm1c*、*Pm2*、*Pm3d*、*Pm4a*、*Pm4b*、*Pm5b*、*Pm13*、*Pm24*、*Pm30*、*Pm2+6*、*Pm2+Mld*、*Pm2+6+?*、*Pm4b+5b*、*Pm4+?*、*Pm5+6*、*Pm21* 抗性基因的平均毒性频率介于 0~17.23% 之间, 表明这些抗性基因仍有较高的利用价值(表 1)。

2.2 5 个小麦白粉菌群体遗传多样性分析

2.2.1 5 个小麦白粉菌群体 AFLP 引物多态性频率分析

E42M65、E45M86、E47M47、E47M49、E78M64 和 E78M86 这 6 对引物组合扩增出的多态性条带数介于 98~186 之间, 多态性百分率为 93.33%~96.88%, 多态性条带大小为 35~493 bp。6 对引物组合共扩增出 831 个多态性位点, 平均每对引物扩得 138.5 个, 多态性位点百分比为 94.86%。

2.2.2 5 个小麦白粉菌群体分子遗传多样性

西安群体、咸阳群体、渭南群体、宝鸡群体和天水群体 5 个小麦白粉菌群体在物种水平上的等位基因数、有效等位基因数、基因多样性指数、香农信息指数和多态性位点百分比分别为 1.9486、1.1653、0.1151、0.2036 和 94.86%。不同地理群体间遗传多样性参数存在差异, 其中, 西安群体的遗传多样性水平最高, 等位基因数、有效等位基因数、基因多样性指数、香农信息指数和多态性位点百分比分别为 1.6724、1.2099、0.1384、0.2283 和 67.24%; 天水群体、渭南群体和咸阳群体次之, 宝鸡群体最低(表 2)。

表1 基于32个已知抗白粉病基因小麦品种(系)的2013年和2014年陕西省小麦白粉菌菌株的毒性频率测定结果

Table 1 Virulence frequencies of *Blumeria graminia* f. sp. *tritici* collected from Shaanxi Province in 2013 and 2014 based on 32 wheat cultivars (lines) with known powdery mildew resistance genes

品种(系) Wheat cultivar (line)	抗性基因 Resistance gene	毒性频率 Virulence frequency (%)		
		2013	2014	平均 Mean
Axminster/8Cc	<i>Pm1a</i>	84.80	85.84	85.32
MIN	<i>Pm1c</i>	8.80	25.66	17.23
Ulka/8Cc	<i>Pm2</i>	15.20	16.81	16.01
Asosan/8Cc	<i>Pm3a</i>	19.20	30.97	25.09
Chul/8Cc	<i>Pm3b</i>	64.00	74.34	69.17
Sonora/8Cc	<i>Pm3c</i>	76.80	83.19	79.99
Kolibri	<i>Pm3d</i>	12.00	8.85	10.42
W150	<i>Pm3e</i>	80.65	86.73	83.69
Mich. Amber/8Cc	<i>Pm3f</i>	87.10	91.15	89.12
Khapli/8Cc	<i>Pm4a</i>	20.80	11.50	16.15
Armada	<i>Pm4b</i>	20.80	9.73	15.27
Aquila	<i>Pm5b</i>	2.40	5.31	3.85
Timgalen	<i>Pm6</i>	30.40	58.41	44.40
Coker 747	<i>Pm6</i>	35.20	45.13	40.17
CI14189	<i>Pm7</i>	99.20	100.00	99.60
Kavkaz	<i>Pm8</i>	88.80	87.61	88.21
R4A	<i>Pm13</i>	3.20	0.00	1.60
Amigo	<i>Pm17</i>	27.20	18.58	22.89
XX186	<i>Pm19</i>	61.29	83.19	72.24
南农 9918 Nannong 9918	<i>Pm21</i>	0.00	0.00	0.00
赤牙糙 Chiyacao	<i>Pm24</i>	2.48	1.77	2.12
5P27	<i>Pm30</i>	22.69	11.50	17.10
CI12632	<i>Pm2+6</i>	5.00	4.42	4.71
Maris Dove	<i>Pm2+Mld</i>	1.64	1.77	1.70
Maris Huntsman	<i>Pm2+6+?</i>	4.84	0.88	2.86
Kenguia 1	<i>Pm4+8</i>	26.67	30.09	28.38
Mission	<i>Pm4b+5b</i>	15.32	8.85	12.09
白兔3号 Baimian 3	<i>Pm4+?</i>	12.10	5.31	8.70
Coker 983	<i>Pm5+6</i>	4.84	14.16	9.50
Normandie	<i>Pm1+2+9</i>	66.13	90.27	78.20
Era	<i>Pm“Era”</i>	12.10	42.48	27.29
小白冬麦 Xiaobaidongmai	<i>Pm“XBD”</i>	12.90	27.43	20.17
阿夫 Funo (CK)	-	100.00	100.00	100.00
Chancellor (CK)	-	100.00	100.00	100.00

表2 陕西省及毗邻甘肃省共5个小麦白粉菌群体的遗传多样性参数
Table 2 Genetic diversity parameters of five *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* populations from Shaanxi Province and the adjacent Gansu Province

群体 Population	样品量 Sample size	等位 基因数 No. of alleles	有效等位 基因数 No. of effective alleles	基因多样 性指数 Gene diversity index	香农信 息指数 Shannon index	多态性 位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点 百分比 Percentage of polymorphic loci (%)
西安群体 Xi'an population	20	1.6724	1.2099	0.1384	0.2283	589	67.24
咸阳群体 Xianyang population	32	1.5331	1.1485	0.0968	0.1612	467	53.31
渭南群体 Weinan population	22	1.5685	1.1535	0.1036	0.1748	498	56.85
宝鸡群体 Baoji population	25	1.4600	1.1300	0.0847	0.1409	403	46.00
天水群体 Tianshui population	19	1.6153	1.1549	0.1103	0.1895	539	61.53
平均水平 Average	-	1.5699	1.1594	0.1068	0.1789	499	56.99
物种水平 Species level	118	1.9486	1.1653	0.1151	0.2036	831	94.86

2.2.3 5个小麦白粉菌群体遗传距离和一致度

西安群体、咸阳群体、渭南群体、宝鸡群体和天水群体5个小麦白粉菌群体间总体遗传距离在0.0010~0.0244之间,遗传一致度在0.9759~0.9990之间,表明群体间遗传距离近,遗传一致度高。陕西省宝鸡群体、西安群体、咸阳群体和渭南群体4个小麦

白粉菌群体之间的遗传距离普遍小于其与甘肃省的天水群体之间的遗传距离,如宝鸡群体与西安群体、咸阳群体和渭南群体的遗传距离分别为0.0114、0.0103和0.0120,而宝鸡群体与甘肃省天水群体的遗传距离为0.0244,遗传一致度则与遗传距离的结果相反(表3)。

表3 陕西省及毗邻甘肃省共5个小麦白粉菌群体遗传距离和遗传一致度

Table 3 Genetic distances and identity among five *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* populations from Shaanxi and Gansu provinces

群体 Population	宝鸡群体 Baoji population	西安群体 Xi'an population	咸阳群体 Xianyang population	渭南群体 Weinan population	天水群体 Tianshui population
宝鸡群体 Baoji population	-	0.9887	0.9897	0.9880	0.9759
西安群体 Xi'an population	0.0114	-	0.9970	0.9959	0.9764
咸阳群体 Xianyang population	0.0103	0.0030	-	0.9990	0.9783
渭南群体 Weinan population	0.0120	0.0041	0.0010	-	0.9836
天水群体 Tianshui population	0.0244	0.0238	0.0219	0.0165	-

对角线以下为遗传距离,对角线以上为遗传一致度。Genetic distance is below diagonal, and genetic identity is above diagonal.

当相似系数为0.96时,西安群体、咸阳群体、渭南群体、宝鸡群体和天水群体5个小麦白粉菌群体被聚为2类,其中陕西省的西安群体、咸阳群体、渭南群体和宝鸡群体聚为一类(图1),甘肃省天水群体单独聚为一类。小麦白粉菌群体间地理距离和分子遗传距离相关性分析结果显示,遗传距离与地理距离呈显著正相关,相关性系数为0.8350($P=$

0.0050)。

2.2.4 5个小麦白粉菌群体遗传分化系数与基因流

宝鸡群体、西安群体、咸阳群体、渭南群体和天水群体5个小麦白粉菌群体总遗传多样性为0.1179,群体内遗传多样性为0.1068,群体间遗传多样性和遗传分化系数分别为0.0111和0.0944,则群体间和群体内的遗传变异分别占总体变异的9.44%

和90.56%,表明变异主要来自于群体内。基因流 N_m 为4.7939,其值大于4,表明这5个小麦白粉菌群体

间存在广泛的基因交流。

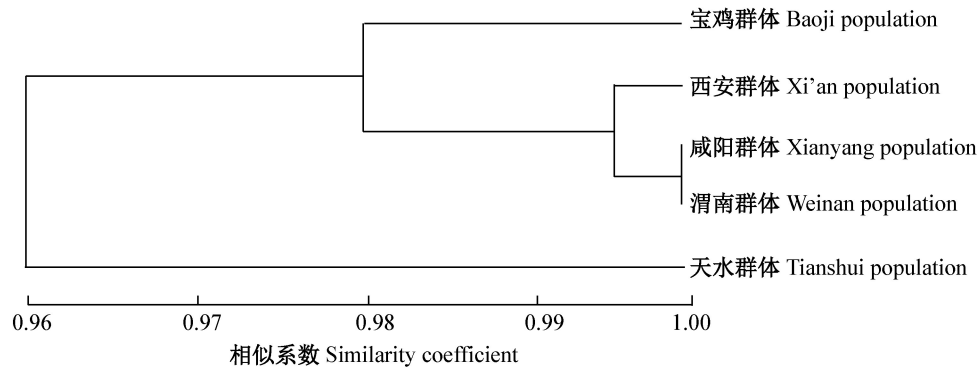


图1 基于非加权组平均法的陕西省及毗邻甘肃省共5个小麦白粉菌群体聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of five *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* populations from Shaanxi and Gansu provinces based on unweighted pair-group method with arithmetic means

3 讨论

本研究对2013年和2014年陕西省西安市、渭南市、咸阳市和宝鸡市的小麦白粉菌毒性进行监测,其结果与史亚迁等(2009)的毒性监测结果有较大变化,其中 $Pm7$ 、 $Pm8$ 和 $Pm19$ 的毒性频率上升幅度较大,而 $Pm2$ 、 $Pm3d$ 、 $Pm6$ 、 $Pm17$ 、 $Pm2+6$ 、 $Pm2+Mld$ 、 $Pm2+6+?$ 、 $Pm4+8$ 、 $Pm4+?$ 、 $Pm5+6$ 和 Pm “Era”的毒性频率有所下降,这可能与近几年陕西省小麦主栽品种的调整有关,同时也与采样地点不同有一定关系。 $Pm1a$ 、 $Pm3b$ 、 $Pm3c$ 、 $Pm3e$ 、 $Pm3f$ 、 $Pm7$ 、 $Pm8$ 、 $Pm19$ 和 $Pm1+2+9$ 的毒性频率在全国大部分地区,如河南(李亚红等,2012)、四川(雷雨等,2015)、甘肃(黄瑾等,2015)、山东(郭霞等,2016)等省均偏高,表明这些基因已失去利用价值,与本研究结果一致。本研究结果表明 $Pm21$ 基因在陕西省的毒性频率为0,Xing et al.(2018)也曾报道 $Pm21$ 基因是目前全国范围内最有效的小麦抗白粉病基因之一。 $Pm21$ 基因来自簇毛麦,目前已经被用于培育多个抗病品种,并被应用到实际生产中(Li et al.,2007)。为避免 $Pm21$ 基因类似于 $Pm8$ 基因在全国大面积单一应用(周阳等,2004;李洪杰等,2011)从而导致小麦白粉病的迅速扩展蔓延,建议将 $Pm21$ 基因与其它有效抗病基因聚合利用。其它 $Pm24$ 和 $Pm5+6$ 等基因在陕西省的毒性频率亦较低,其在河南(李亚红等,2012)、新疆(王振花等,2017)等省却表现较高的毒性频率。虽然陕西省小麦白粉菌毒性结构与我国其它地区有所差异,但一些主要基因的毒性频率与大部分地区相似,这与目前我国小麦主栽品种抗源单一化,各地大部分主栽品种血缘关系相同或相近有

关。在小麦抗病育种中,应尽可能鉴定和应用多种抗源,减轻单一抗源对小麦白粉菌的选择压力,最大限度地发挥抗病品种在小麦白粉病防治中的作用。

本研究利用AFLP标记对陕西省及毗邻甘肃省的5个小麦白粉菌群体进行遗传多样性分析,结果表明不同地理群体间遗传多样性存在差异,小麦白粉菌群体的遗传变异主要来自于群体内,不同群体间存在基因交流,小麦白粉菌群体的遗传距离与地理距离呈显著正相关。关于小麦白粉菌的遗传距离与地理距离的研究很多,如Park et al.(2008)和Troch et al.(2012)认为小麦白粉菌群体遗传分化存在地理上的差异;Cowger et al.(2015)对美国12个州的小麦白粉菌群体的研究表明,分子遗传距离与地理距离呈弱正相关;Zeng et al.(2014)对我国8个小麦主要种植区的1082株小麦白粉菌的遗传多样性进行分析,结果表明分子遗传距离与地理距离显著相关;雷雨等(2015)研究表明,四川省小麦白粉菌群体分子遗传距离与地理距离相关,但不显著。这些研究结果与本研究结果略有差异,究其原因可能受样本采集地点和采样量等因素的影响。本研究结果表明小麦白粉菌群体的遗传距离与地理距离呈显著正相关,从另一个方面证明了不同小麦白粉菌群体间存在基因交流,地理距离越近,小麦白粉菌群体基因交流的概率就越大。

小麦白粉菌群体的毒性结构是动态变化的,同一地区不同年份、同一年份不同地区之间都会有一定的差异,因此,监测其毒性结构是一个基础和持续的工作。下一步研究中应扩大样本采集地点和数量,同时应用SNP标记对小麦白粉菌进行遗传多样

性研究。

参 考 文 献 (References)

- Brown JKM, Simpson CG. 1994. Genetic analysis of DNA fingerprints and virulences in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Current Genetics*, 26(2): 172-178
- Cowger C, Parks R, Kosman E. 2015. Structure and migration in U.S. *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* populations. *Phytopathology*, 106(3): 295-304
- El-Shamy MM, Emara HM, Mohamed ME. 2016. Virulence analysis of wheat powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) and effective genes in Middle Delta, Egypt. *Plant Disease*, 100(9): 1927-1930
- Guo X, Xin XQ, Zhang M, Wu B, Wang SJ, Zhao JH. 2016. The virulence and genetic diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in Shandong. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 873-874 (in Chinese) [郭霞, 辛相启, 张眉, 吴斌, 王升吉, 赵玖华. 2016. 山东小麦白粉病菌的毒性监测及遗传多样性分析. *植物保护学报*, 43(5): 873-874]
- Han B, Lin RM, Cao YY, Xu SC. 2006. Comparison of the methods of isolating wheat yellow rust genomic DNA. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22(4): 81-83 (in Chinese) [韩冰, 蔺瑞明, 曹远银, 徐世昌. 2006. 小麦条锈菌DNA提取方法的比较研究. *中国农学通报*, 22(4): 81-83]
- He JM, Song YL, Zhang ZS, He WL. 1998. Wheat powdery mildew and control I: distribution, symptom and damage of wheat powdery mildew. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, (1): 17-18 (in Chinese) [何家泌, 宋玉立, 张忠山, 何文兰. 1998. 小麦白粉病及其防治 I: 小麦白粉病的分布、症状和危害. *河南农业科学*, (1): 17-18]
- Huang J, Huang MM, Li YK, Cao XW, Jia QZ, Zhang B, Sun ZY, Luo HS, Wang XM, Cao SQ, et al. 2015. Virulence of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* population and resistance in wheat cultivars at seedling stage in Gansu Province. *Plant Protection*, 41(5): 169-173 (in Chinese) [黄瑾, 黄苗苗, 李亚凯, 曹辛未, 贾秋珍, 张勃, 孙振宇, 骆惠生, 王晓明, 曹世勤, 等. 2015. 甘肃省小麦白粉菌群体毒性及小麦品种苗期抗白粉病性分析. *植物保护*, 41(5): 169-173]
- Huo YF, Cao LH, Duan XY, Zhou YL, Song YL, He WL. 2010. Genetic diversity of the wheat powdery mildew populations in the west of Henan Province. *Journal of Plant Protection*, 37(6): 481-486 (in Chinese) [霍云凤, 曹丽华, 段霞瑜, 周益林, 宋玉立, 何文兰. 2010. 河南省西部山区小麦白粉菌群体遗传多样性分析. *植物保护学报*, 37(6): 481-486]
- Jia SF, Duan XY, Zhou YL, Lu GD, Wang ZH. 2007. Establishment of ISSR-PCR reaction system for *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and its application in diversity analysis of this pathogen. *Journal of Plant Protection*, 34(5): 493-499 (in Chinese) [贾少锋, 段霞瑜, 周益林, 鲁国东, 王宗华. 2007. 小麦白粉菌ISSR分子标记体系构建及其分离菌株的多样性分析. *植物保护学报*, 34(5): 493-499]
- Lei Y, Liu N, Gong GS, Zhang M, Wang X, Qi XB, Zhou Y, Chen HB, Yang JZ, You Q, et al. 2015. Virulence and genetic diversity analysis of wheat powdery mildew population in southwestern area of Sichuan. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45(5): 509-519 (in Chinese) [雷雨, 刘娜, 龚国淑, 张敏, 王旭, 祁小波, 周游, 陈华保, 杨继芝, 游琴, 等. 2015. 四川西南部小麦白粉菌群体毒性及遗传多样性分析. *植物病理学报*, 45(5): 509-519]
- Li GP, Chen PD, Zhang SZ, Wang XE, He ZH, Zhang Y, Zhao H, Huang HY, Zhou XC. 2007. Effect of the 6VS.6VL translocation on agronomic traits and dough properties of wheat. *Euphytica*, 155(3): 305-313
- Li HJ, Wang XM, Song FJ, Wu CP, Wu XF, Zhang N, Zhou Y, Zhang XY. 2011. Response to powdery mildew and detection of resistance genes in wheat cultivars from China. *Acta Agronomica Sinica*, 37(6): 943-954 (in Chinese) [李洪杰, 王晓鸣, 宋凤景, 伍翠平, 武小菲, 张宁, 周阳, 张学勇. 2011. 中国小麦品种对白粉病的抗性反应与抗病基因检测. *作物学报*, 37(6): 943-954]
- Li YC, Meng QL, Shi FM, Ma LG, Liu J, Zhang YH. 2015. Virulence structure analysis of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* on wheat in Heilongjiang Province in 2013. *Crops*, (4): 20-22 (in Chinese) [李易初, 孟庆林, 石凤梅, 马立功, 刘佳, 张匀华. 2015. 2013年黑龙江省小麦白粉菌毒力结构分析. *作物杂志*, (4): 20-22]
- Li YH, Cao LH, Zhou YL, Song YL, He WL, Duan XY, Yang GQ. 2012. Virulence and genetic diversity analyses of wheat powdery mildew population in Henan Province during 2009-2010. *Journal of Plant Protection*, 39(1): 31-38 (in Chinese) [李亚红, 曹丽华, 周益林, 宋玉立, 何文兰, 段霞瑜, 杨共强. 2012. 2009-2010年河南省小麦白粉菌群体毒性及其遗传多样性分析. *植物保护学报*, 39(1): 31-38]
- Liu N, Liu ZL, Gong GS, Zhang M, Wang X, Zhou Y, Qi XB, Chen HB, Yang JZ, Luo PG, et al. 2015. Virulence structure of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and its genetic diversity by ISSR and SRAP profiling analyses. *PLoS ONE*, 10(6): e0130881
- Ming ZY, Wang BT, Zhou YL, Duan XY, Zou YF. 2012. The sensitivity of population of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* isolates to temperature in 2009. *Acta Phytopathologica Sinica*, 42(3): 290-296 (in Chinese) [明章勇, 王保通, 周益林, 段霞瑜, 邹亚飞. 2012. 2009年我国部分麦区小麦白粉病菌群体对温度的敏感性研究. *植物病理学报*, 42(3): 290-296]
- Nei M. 1975. Molecular population genetics and evolution. *Frontiers of Biology*, 40: 1-288
- Parks R, Carbone I, Murphy JP, Marshall D, Cowger C. 2008. Virulence structure of the eastern US wheat powdery mildew population. *Plant Disease*, 92(7): 1074-1082
- Shi YQ, Wang BT, Li Q, Wu XY, Wang F, Liu H, Tian YE, Liu QR. 2009. Analysis on the virulence genes of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* and the resistance genes of wheat commercial cultivars in Shaanxi Province. *Journal of Triticeae Crops*, 29(4): 706-711 (in Chinese) [史亚千, 王保通, 李强, 吴兴元, 王芳, 刘恒, 田月娥, 刘倩茹. 2009. 陕西省小麦白粉菌毒性结构及主栽小麦品种抗性基因的初步分析. *麦类作物学报*, 29(4): 706-711]
- Si QM, Zhang XX, Duan XY, Sheng BQ, Zhou YL. 1992. On gene

- analysis and classification of powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) resistant wheat varieties. *Acta Phytopathologica Sinica*, 22(4): 63–69 (in Chinese) [司权民, 张新心, 段霞瑜, 盛宝钦, 周益林. 1992. 小麦抗白粉病品种的基因分析与归类研究. *植物病理学报*, 22(4): 63–69]
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4803): 787–792
- Troch V, Audenaert K, Bekaert B, Höfte M, Haesaert G. 2012. Phylogeography and virulence structure of the powdery mildew population on its ‘new’ host triticale. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 76
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407–4414
- Wang ZH, Liu W, Gao HF, Fan JR, Zhou YL. 2017. Monitoring and analysis of virulence of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 54(10): 1903–1910 (in Chinese) [王振花, 刘伟, 高海峰, 范洁茹, 周益林. 2017. 新疆小麦白粉病菌群体的毒性监测和分析. *新疆农业科学*, 54(10): 1903–1910]
- Whitlock MC, McCauley DE. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4N_m + 1)$. *Heredity*, 82(Pt2): 117–125
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15(4): 323–354
- Wyand RA, Brown JKM. 2003. Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. *Molecular Plant Pathology*, 4(3): 187–198
- Xiao ZJ, Jiang XL, Li XX, Wang HM, Zhu WH. 2009. Assessment of genetic diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* by RAPD analysis in Guizhou Province. *Hubei Agricultural Sciences*, 48(4): 669–772 (in Chinese) [肖仲久, 蒋选利, 李小霞, 王宏梅, 朱文华. 2009. 基于 RAPD 对贵州省小麦白粉菌的遗传多样性评价. *湖北农业科学*, 48(4): 769–772]
- Xing LP, Hu P, Liu JQ, Witek K, Zhou S, Xu JF, Zhou WH, Gao L, Huang ZP, Zhang RQ, et al. 2018. *Pm21* from *Haynaldia villosa* encodes a CC-NBS-LRR protein conferring powdery mildew resistance in wheat. *Molecular Plant*, 11(6): 874–878
- Xu Z, Duan XY, Zhou YL, Guo QY, Yao Q, Cao SQ. 2014. Population genetic analysis of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in Qinghai Province, China. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(9): 1952–1961
- Zeng FS, Yang LJ, Gong SJ, Shi WQ, Zhang XJ, Wang H, Xiang LB, Xue MF, Yu DZ. 2014. Virulence and diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* populations in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(11): 2424–2437
- Zhao ZH, Huang J, Lu Mi, Wang XM, Wu LF, Wu XF, Zhao X, Li HJ. 2013. Virulence and genetic diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* collected from Shandong and Hebei provinces. *Acta Agronomica Sinica*, 39(8): 1377–1385 (in Chinese) [赵紫慧, 黄江, 陆鸣, 王晓鸣, 吴龙飞, 武小菲, 赵鑫, 李洪杰. 2013. 山东省和河北省小麦白粉菌毒性与遗传多样性分析. *作物学报*, 39(8): 1377–1385]
- Zhou Y, He ZH, Zhang GS, Xia LQ, Chen XM, Gao YC, Jing ZB, Yu GJ. 2004. Utilization of 1BL/1RS translocation in wheat breeding in China. *Acta Agronomica Sinica*, 30(6): 531–535 (in Chinese) [周阳, 何中虎, 张改生, 夏兰琴, 陈新民, 高永超, 并赵斌, 于广军. 2004. 1BL/1RS 易位系在我国小麦育种中的应用. *作物学报*, 30(6): 531–535]
- Zhu GQ, Chi WJ, Wu XX, Cao YY. 2015. Analysis of genetic diversity and geographic relationship of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in northeastern wheat region. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 44(3): 77–82 (in Chinese) [朱桂清, 迟文娟, 吴限鑫, 曹远银. 2015. 东北小麦白粉菌遗传多样性及其地域关联性分析. *河南农业科学*, 44(3): 77–82]

(责任编辑:张俊芳)